



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**LA FAMILIA MULTIGÉNICA DE LAS HEXOCINASAS EN EL PEZ
CEBRA: ANÁLISIS DE SU ESTRUCTURA, EXPRESIÓN,
FUNCIÓN Y FILOGENIA**

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ELIZABETH GUADALUPE MORENO ARRIOLA

ASESOR: Dr. ANTONIO VELÁZQUEZ ARELLANO

COASESOR: M. en. C. DANIEL ORTEGA CUELLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
 ATN: L. A. ARACELI HERRERA DOMÍNGUEZ
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Artículo: La familia multigénica de las hexocinasas en el pez cebrá: análisis de su estructura, expresión, función y filogenia.

de la Opción de Titulación por Actividad de Investigación que presenta: la pasante:
Elizabeth Guadalupe Moreno Arriola
 con número de cuenta: 30111407-9 para obtener el título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Junio de 2009.

PRESIDENTE	<u>Dr. Antonio Velázquez Arellano</u>
VOCAL	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>
SECRETARIO	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>M.C. Oscar Zúñiga Lemus</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.C. Maritere Domínguez Rojas</u>

Gracias te doy Señor, por que me has llenado de bendiciones, por que me diste una familia que desde que recuerdo me han dado su constante e incondicional apoyo y por que ahora tengo la oportunidad de culminar un proyecto que es la base de uno aun mayor.

Mamá tú que siempre me has dado apoyo y ternura, que siempre has estado junto a mí en los triunfos y tropiezos, te ofrezco este pequeño y humilde testimonio de agradecimiento por todos los innumerables esfuerzos que has hecho para que yo pueda cumplir mis metas.

A mi Mama, a mi Papa y mi hermano Eric, le agradezco por ayudarme a que este momento llegara, por alentar mis ideales, por estar ahí cuando yo no estaba, por hacerme ver que nada es fácil pero que si es posible.

A mi abuelito Tito que ha sido como mi segundo padre, a mi abuelita Alicia (q.e.d.) y a mi Tía Vicky que ambas han sido como mi segunda madre les agradezco con todo mi corazón el apoyo invaluable y el amor con el que me han cobijado, ayudándome a ser mejor hija, hermana, nieta y sobrina cada día.

Los amo.

Gracias a mis tías Hilda y Paty por estar ahí cuando he necesitado de su cariño, presencia y ayuda.

Gracias a mis tíos Gabby, Mario y Gonzalo por su apoyo que para mí fue de gran valor.

Gracias a todos mis profesores en la FESC que me contagiaron su amor y pasión por la carrera de Q.F.B.

Gracias al Dr. Velázquez, a Daniel, a Ángeles, a Rafa y a Sara, por recibirme con los brazos abiertos en la Unidad de Genética de la Nutrición-UNAM, donde encontré el camino profesional que quiero seguir y por permitirme dar un importante paso en él.

Para ustedes toda mi gratitud, respeto y admiración

“Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Sigue aunque todos esperen que abandones.

Siempre haz que te tengan respeto.

¡Nunca te detengas!”

Madre Teresa de Calcuta



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpb



The hexokinase gene family in the zebrafish: Structure, expression, functional and phylogenetic analysis

Rafael González-Alvarez^a, Daniel Ortega-Cuellar^a, Armando Hernández-Mendoza^a,
Elizabeth Moreno-Arriola^a, Karina Villaseñor-Mendoza^a, Amanda Gálvez-Mariscal^b,
María Estela Pérez-Cruz^c, Ignacio Morales-Salas^c, Antonio Velázquez-Arellano^{a,*}

^a Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Pediatría, México City, Mexico

^b Programa Universitario de Alimentos and Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico

^c Unidad de Servicio Académico, Acuario de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico

Información del Artículo:

Recibido: 12 de Septiembre de 2008

Recepción de la Revisión: 26 de Noviembre de 2008

Aceptado: 26 de Noviembre de 2008

Disponible *on line*: 3 de Diciembre de 2008

**LA FAMILIA MULTIGÉNICA DE LAS HEXOCINASAS EN EL PEZ
CEBRA: ANÁLISIS DE SU ESTRUCTURA, EXPRESIÓN,
FUNCIÓN Y FILOGENIA**

Rafael González-Álvarez^a, Daniel Ortega-Cuellar^a, Armando Hernández-Mendoza^a, Elizabeth Moreno-Arriola^a, Karina Villaseñor-Mendoza^a, Amanda Gálvez-Mariscal^b, María Estela Pérez-Cruz^c, Ignacio Morales-Salas^c, Antonio Velázquez-Arellano^{a,*}

^a Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Pediatría, México.

^b Programa Universitario de Alimentos y Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México

^c Unidad de Servicio Académico, Acuario de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Resumen

La fosforilación de la glucosa catalizada por las hexocinasas (HXK) es el primer paso fundamental para la utilización de glucosa. Aunque se conoce acerca del metabolismo de la glucosa en especies de peces comerciales, el conocimiento sobre éste, es casi nulo en el pez cebra (*Danio rerio*), que es un organismo modelo importante para la investigación biológica. Nosotros buscamos los genes de las hexocinasas en este pez por medio de análisis BLAST; determinamos su expresión en hígado, músculo, cerebro y corazón; evaluamos su respuesta al ayuno y a la administración de glucosa; y realizamos estudios de homología de secuencias para vislumbrar su historia evolutiva. Confirmamos por estudios de RT-qPCR que las seis secuencias de DNA anotadas como posibles hexocinasas en el genoma de este pez en el GenBank del NCBI se transcriben. La distribución de los genes de las HXKs en los órganos estudiados del pez cebra es similar a la de mamíferos, los cuales son organismos evolutivamente distantes. De éstos genes, DrGLK y DrSHXK1 se expresan en el hígado del pez, DrHXK1 en cerebro y corazón, y DrHXK2 en el músculo. El único gen que respondió a la administración de glucosa fue DrGLK en hígado. Su expresión es inducida aproximadamente 1 hora después de la inyección intraperitoneal de glucosa, pero no después de la inyección con solución salina. La comparación de las secuencias correspondientes del pez y de mamíferos, implica que en ambos grupos taxonómicos, las principales isoformas de músculo y cerebro son producto de la fusión del gen ancestral, mientras que la glucocinasa del pez y de mamíferos ha permanecido sin duplicar sus genes.

Palabras clave: *Danio rerio*, Ayunado, Alimentado, Glucocinasa, Utilización de glucosa, Hexocinasa, Evolución molecular, Inanición

1. Introducción

La fosforilación de la glucosa catalizada por las hexocinasas (HXK) es el primer paso fundamental para la utilización de glucosa. La familia de las hexocinasas se compone de varias enzimas relacionadas evolutivamente; todas ellas catalizan la fosforilación de la glucosa para producir glucosa-6-fosfato. Las cuatro isoenzimas de la hexocinasa en mamíferos (ATP: D-hexosa-6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1) se designan como I, II, III y IV de acuerdo a su movilidad electroforética (Katzen et al., 1965). Las hexocinasas I, II y III comparten varias propiedades, incluyendo su peso molecular de 100 kDa, una alta afinidad por la glucosa e inhibición por el producto de reacción, que es la glucosa-6-fosfato (Grossbard y Schimke, 1966). La hexocinasa IV o D (también llamada glucocinasa hepática) tiene un peso molecular de 50 kDa y posee propiedades cinéticas que no comparte con las demás hexocinasas: (1) baja afinidad por glucosa, (2) curvas de saturación sigmoidales de su sustrato y (3) la inhibición por una proteína reguladora, así como por una larga cadena de acil-CoAs (Van Schaftingen, 1994).

Es muy probable que las hexocinasas hayan evolucionado a partir de un gen ancestral que codificaba para una proteína de 50 kDa que dio lugar a las hexocinasas de 100 kDa por eventos duplicación/fusión, así como para la

glucocinasa hepática de 50 kDa (Ureta, 1982). La hexocinasa II posee dos sitios catalíticos distintos, uno en cada mitad de sus extremos carboxilo y amino. Si bien las hexocinasas I y III poseen solo un sitio activo en la mitad de su extremo carboxilo, mientras que su extremo amino es catalíticamente inactivo. Así, se ha sugerido que la hexocinasa II es la más parecida a la hexocinasa ancestral, que se generó por eventos de duplicación/fusión de los genes (Tsai y Wilson, 1995).

En cerebro y músculo de mamíferos las hexocinasas I y II (respectivamente) y la glucocinasa hepática, se han estudiado con mucho más detalle que la hexocinasa III, la cual está ausente o presente (en bajas cantidades) en muchos tejidos; por lo tanto, su papel fisiológico es menos claro (Katzen y Schimke 1965). El rasgo distintivo de esta última isoenzima es que es inhibida por el exceso de glucosa (Ureta, 1982). Debido a la baja K_m de las hexocinasas I, II y III, estas mantienen su actividad máxima a concentraciones de glucosa tan bajas como 0.1 mM, y están prácticamente saturadas a una concentración normal de glucosa en sangre (Ureta et al. 1971a, b; Storer y Cornish-Bowden 1976). En contraste, la muy alta K_m (8 mM) de la glucocinasa hepática por la glucosa, concuerda con la cantidad variable de glucosa que recibe el hígado a través de la vena porta, lo que le permite al hígado disminuir la glucosa en sangre en el período postabsortivo (Niemeyer et al., 1975). La glucocinasa hepática también está presente en células beta pancreáticas glucosensibles y en regiones del cerebro como el hipotálamo, por lo que actúa

como censor de cambios en los niveles de glucosa circulante (Matschinsky et al., 2006).

En contraste con los mamíferos, el control de glucosa en sangre en peces es muy diferente, la utilización de carbohidratos es poco eficaz en muchas especies, clasificándose como: pobre, intermedia o buena en otras (Panserat et al., 2000a; Moon 2001). Por otra parte, existen numerosos informes sobre estudios del metabolismo de la glucosa en especies comerciales (por ejemplo, trucha dorada, trucha arcoíris y la carpa), incluyendo investigaciones acerca de la distribución en tejidos y la regulación de su glucocinasa hepática, la cual es inducible por insulina y alimentos así como sucede en mamíferos (Panserat et al., 2000a, b; Soengas et al., 2006; Egea et al., 2007). Por otra parte, el conocimiento es nulo acerca de la glucocinasa hepática en el pez cebra, al igual que, de su metabolismo de carbohidratos. El pez cebra es una especie que se ha convertido en uno de los organismos modelo más importantes para la investigación genómica, biología del desarrollo, fisiológica y de enfermedades; aunado a que su genoma, se ha secuenciado recientemente (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/zebrafish/>).

Debido al incremento en la importancia del pez cebra en muchas áreas de la investigación biológica, y como parte de nuestro proyecto en curso sobre la evolución del control genético del metabolismo del carbono, buscamos los

genes de las hexocinasas en el pez. De los seis genes anotados como hexocinasas en el genoma del pez cebra en el GenBank del NCBI, realizamos estudios de homología de secuencias para vislumbrar su historia evolutiva y determinamos su expresión en hígado, músculo, cerebro y corazón para estudiar la distribución en dichos órganos por RT-qPCR. Analizamos su respuesta al ayuno y a la administración de glucosa, encontrando que la glucocinasa hepática del pez se comporta de manera similar a la glucocinasa hepática de mamíferos.

2. Materiales y Métodos

2.1. Análisis *in silico* de las hexocinasas del pez cebra

Para determinar el grado de similitud de las seis secuencias anotadas como hexocinasas en el servidor NCBI para el pez cebra, usamos el programa BLAST con nucleótidos y proteínas, utilizando las secuencias de mamíferos (rata y humano) y peces [(trucha dorada (*Sparus aurata*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y carpa común (*Cyprinus carpio*)] como referencia. (Tabla 1). Las secuencias obtenidas se utilizaron posteriormente para determinar la relación filogenética entre las hexocinasas del pez y de los mamíferos (ver más adelante) así como para el diseño de los oligonucleótidos (Tabla 2) para cuantificar sus respectivos mRNA por medio del análisis de RT-qPCR.

Tabla 1. Número de acceso de las secuencias de aminoácidos de las hexocinasas reportadas en el GenBank del NCBI, usadas para el análisis de similitud por BLAST y filogenia.

Species	Accession no
Human (<i>Homo sapiens</i>)	
Hexokinase I (<i>HsHXX1</i>)	P19367
Hexokinase II (<i>HsHXX2</i>)	P52789
Hexokinase III (<i>HsHXX3</i>)	P52790
Glucokinase (<i>HsGLK</i>)	P35557
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	
Hexokinase I (<i>RnHXX1</i>)	P05708
Hexokinase II (<i>RnHXX2</i>)	P27881
Hexokinase III (<i>RnHXX3</i>)	P27926
Glucokinase (<i>RnGLK</i>)	NP_036697
Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) (<i>CcHXX1</i>)	AAF28854
Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>) (<i>SaGLK</i>)	AAC33585
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (<i>OmGLK</i>)	AAC33586
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	
Similar to Hexokinase 1 (<i>DrSHXX1</i>)	XP_686223
Hexokinase 1 (<i>DrHXX1</i>)	AAH67330
Hexokinase 2 (<i>DrHXX2</i>)	AAH45496
Glucokinase (<i>DrGLK</i>)	AAI22360
Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
Hexokinase 1 (<i>SchXX1</i>)	P04806.2
Hexokinase 2 (<i>SchXX2</i>)	NP_011261
Glucokinase (<i>ScGLK</i>)	NP_009890

Tabla 2. Secuencias de la familia de los genes de las hexocinasa (Gen Bank, NCBI) y sus secuencias de oligonucleótidos (5' → 3') usadas en este estudio.

Sequence	Accession no.	Sense	Anti-sense	Probe
Glucokinase (<i>DrGLK</i>)	AAI22360	GAA GGT GGA AAC CAA ACA TCA CAT G	GCC GGC AAT GTA ATC AAA CAA CA	CCT GAA GAT GCC ATG ACC G
ADP-dependent glucokinase 1 (<i>DrADPGK1</i>)	NM_001079965	TCA GAT AAG GAG GTT TTC CAG AGG AT	CGT TTC CGC CCA CAT AAA GC	CAG AGT ATC CCG GCG CTC A
ADP-dependent glucokinase 2 (<i>DrADPGK2</i>)	XM_689665	GCC AAC AGG TAT ATT GTC CAT AGT GA	GCT GTT TAG CAT CTC CTG AAA TTG C	CCA TGG AGT CCA GAT ATG
Hexokinase 1 (<i>DrHXK1</i>)	BC067330	GGT GAA TTG GAC GAA GGG CTT TAA	CCT CTT GAT CCC CTC TCT CAG AAG	ACT GTG AAG GTG AAG ATG T
Hexokinase 2 (<i>DrHXK2</i>)	BC045496	AAA ACT CGC GGG ATC TTC GA	CTC AAT GCC AAA CGA TCA CTT TCA	ATC TGC GAC AAG AAC TT
Similar to hexokinase 1 (<i>DrSHXK1</i>)	XM_681131	AAG GTG GTC CGC CAT CTG	GGC ACT GCC ACT TTC AGA CA	CCA TGT GCG TTT TGT G

2.2. Peces

Los ejemplares del pez cebra (*Danio rerio*) fueron donados por el Acuario de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Nacional Autónoma de México (UNAM). Para el análisis, se utilizaron machos juveniles con un promedio de edad de 60 días, que se mantuvieron de acuerdo a protocolos estándar (Nüsslein-Volhard, 2002). Su peso fue de $0.21 \pm 0.055\text{g}$ ($n=60$). Los peces se alimentaron dos veces al día a saciedad y que son los que denominamos “peces alimentados”. Para alimentar a los peces, utilizamos un alimento

comercial [Dry Fish Flakes de Tropical Fishes (Wardley, New Plymouth, New Zealand)], que contiene: 40% de proteínas y 4% de grasa como mínimo y 5% de fibra, 8% de humedad y 19% de cenizas como máximo. Los peces se sacrificaron por decapitación usando los protocolos aprobados por el Comité de Ética de Animales de Investigación de la UNAM (www.unam.mx).

2.3. Diseño Experimental

Posteriormente, determinamos el nivel de expresión de cada uno de los genes preferentemente expresados en los órganos estudiados de los peces alimentados (n=5), y se compararon con los niveles de expresión de las hexocinasas de los peces ayunados por 48 hrs. Además el curso del tiempo de la expresión del mRNA de las hexocinasas se determino 15, 30, 45 y 60 min (n=5 cada uno) después de inyectar intraperitonealmente (IP) una solución de glucosa (300mg/kg; Harmon et al., 1991) a los peces ayunados por 48 hrs mientras que al grupo control se le inyectó solución salina. La sangre se recolectó en todos los animales al momento de la decapitación para determinar la concentración de glucosa.

2.4. Extracción de RNA y análisis por RT-qPCR

Al hígado, músculo, cerebro y corazón se les extrajo el RNA total por medio del método del TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración del RNA se determinó mediante su

absorbancia a una longitud de onda de 260nm. Para eliminar los restos de DNA genómico, el RNA fue digerido con DNasa I (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). La integridad del RNA fue confirmada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Después, se realizaron diferentes diluciones del RNA total de cada uno de los órganos (50, 250, 500 y 1000 ng), estos RNAs se convirtieron a cDNA usando la transcriptasa reversa M-MLV y los hexámeros al azar (Primers; Invitrogen). Los resultados se normalizaron con la sonda TaqMan 18SrRNA de humano (Applied Biosystems). La expresión de los mRNAs se cuantifico mediante la amplificación correspondiente de sus cDNAs por PCR en tiempo real (qPCR) utilizando sondas TaqMan de 200 a 250 pb (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Tabla 2), incubando 1µl del cDNA en 10µl de volumen de reacción. Las determinaciones se realizaron por triplicado, la amplificación se realizo utilizando un equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El análisis de los datos para la cuantificación de RNA se realizó por el método comparativo C_T (Livak y Schmittgen, 2001).

2.5. Cuantificación de Glucosa

La glucosa en sangre se obtuvo inmediatamente después de la decapitación de los peces y se midió con en el glucómetro Optium Xceed de Abbott (Alameda, CA, USA). Dicha concentración no fue determinada en plasma, debido a que la cantidad de sangre que se puede obtener por animal es muy pequeña, en promedio un pez cebra cuenta con alrededor del 3% de sangre con respecto a su masa (Nüsslein-Volhard, 2002); la diferencia entre la

concentración en los dos fluidos es de aproximadamente 15%, pero para nuestros propósitos los valores absolutos de cada uno no son tan relevantes como la diferencia entre ellos.

2.6. Análisis de la evolución molecular

Las estructuras de las uniones de cada uno de los genes de las hexocinasas de *D. rerio* se determinaron por recopilación de la información obtenida en el servidor NCBI. Las mitades amino y carboxilo de cada una de las hexocinasas de 100 kDa se analizaron como si fueran polipéptidos independientes (Wilson, 1995). Los alineamientos se realizaron utilizando el programa CLUSTAL W (Higgins y Sharp, 1988). Los números de acceso al GenBank de las secuencias de aminoácidos utilizados en este estudio se encuentran en la Tabla 1. El árbol filogenético se construyó con el software MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) y el análisis estadístico se realizó con el método Neighbor-Joining (N.J.) usando un valor de arranque de 1000 repeticiones (Saitou y Nei, 1987).

2.7. Análisis Estadístico

Los resultados de al menos tres experimentos independientes se presentaron como la media \pm la desviación estándar (SD). Para la diferencia entre los grupos se realizó el análisis de ANOVA utilizando el software GraphPad Prism v.4 para Macintosh (GraphPad Software, Inc.). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas a un nivel $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Estructura

De acuerdo al GenBank del NCBI, el genoma del pez cebra tiene anotadas seis secuencias referidas como hexocinasas (Tabla 1). En nuestro análisis encontramos, que estas secuencias son similares a aquellas que ya han sido probadas como hexocinasas en otros peces (carpa común, trucha dorada y trucha arcoíris), (Panserat et al., 2000a, b), así como en la rata y el humano. La estructura genómica de la familia multigénica de las hexocinasas del pez cebra comparada con las de humano y rata se muestran en la figura 1. Tres de los genes del pez (DrGLK, DrADPGK1 y DrADPGK2) codifican para proteínas que tienen un peso molecular de 50 kDa, estos genes tienen siete exones y están localizados en los cromosomas 8, 25 y 17 respectivamente. Los otros tres genes codifican para proteínas con un peso molecular de 100 kDa DrSHXK1 y DrHXX1 y contienen 18 exones mientras que DrHXX2 solo tiene 16 (Figura 1). La localización cromosómica de la primera no se conoce, mientras que de las otra dos se sabe que están en los cromosomas 13 y 5 respectivamente. Estas secuencias se usaron para el diseño de sondas TaqMan y corroborar así la expresión de sus respectivos mRNA por RT-qPCR.



Figura1. Estructura genómica de las hexocinasas de humano, rata y pez cebra. Los rectángulos representan a los exones y las líneas a los intrones. Los números indican el tamaño del exón en nucleótidos. Los números de acceso utilizados para determinar la estructura de las tres familias de hexocinasas están descritos en las tablas 1 y 2. Los intrones se redujeron para efectos de esta presentación. Hs: humano (*Homo sapiens*), Rn: rata (*Rattus norvegicus*), Dr: pez cebra (*D. rerio*); HXK1: hexocinasa 1, HXK2: hexocinasa 2, SHXK1: similar a hexocinasa 1, GLK: glucocinasa, ADPGK1: ADP-dependiente de glucocinasa 1, ADPGK2: ADP-dependiente de glucocinasa 2.

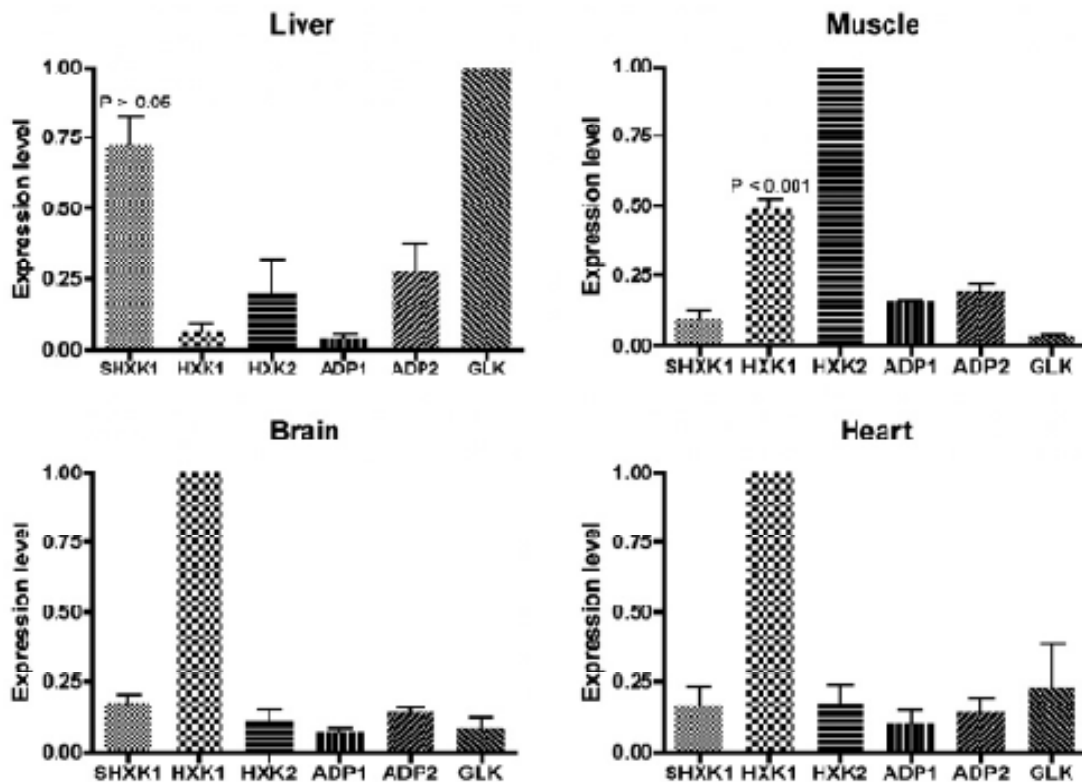


Figura 2. Cantidades relativas de los RNA mensajeros de las diferentes hexocinasas del pez cebra presentes en hígado, músculo, cerebro y corazón. Los RNA mensajeros son representados como fracción del máximo nivel de expresión en cada órgano. Las abreviaciones son las mismas que en la figura 1. En hígado se expresan principalmente DrSHXK1 y DrGLK, la diferencia de los niveles de expresión entre ellas no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$). En músculo son expresadas DrHXK1 y DrHXK2, la diferencia entre sus niveles de expresión es estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Por último, DrHXK1 es la única isoenzima sustancialmente expresada en cerebro y corazón.

3.2. Expresión de la hexocinasas en los diferentes órganos

Para nuestro estudio, utilizamos estas secuencias de hexocinasas para cuantificar sus RNA por RT-qPCR (Tabla 2). Las secuencias DrGLK y DrSHXK1 son las que se expresan preferentemente en el hígado, la DrSHXK1 es la que se expresa en menor cantidad. En músculo las hexocinasas con mayor expresión son las DrHXK1 y DrHXK2, aunque la primera en menor grado. DrHXK1 también se expresa en cerebro y corazón. DrADPGK1 y DrADPGK2 tienen niveles de expresión muy bajos en los órganos estudiados, pero esto fue suficiente para confirmar que no son pseudogenes. Sin embargo, no fueron considerados para estudios posteriores.

3.3. Respuesta de las hexocinasas al ayuno y a la administración de glucosa

Analizamos la expresión de los genes de las hexocinasas en cuatro órganos, en respuesta a la inanición y subsecuente administración de glucosa (datos no mostrados). Solo la expresión de la hexocinasa DrGLK cambia significativamente en el hígado de los peces en ayuno, de 100-110 a 10-15ng de RNAm. ($p < 0.001$), mientras que el nivel de la glucosa en sangre fue de aproximadamente 10mM en ambos grupos. No hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en los niveles de expresión de los genes DrHXK1, DrHXK1 y DrHXK2 en los diferentes órganos, comparando los grupos en ayuno con los que se alimentaron (resultados no mostrados)

Basados en estos resultados, medimos la expresión del gen DrGLK a diferentes tiempos en hígados de animales en ayuno y después de la administración de glucosa, y utilizamos como control peces a los que se les inyectó solución salina (figura 3). El RNAm de la DrGLK fue sustancialmente incrementado en el grupo inyectado con glucosa, pero solo después de una hora de la inyección, mientras que en el control no cambió. Por otro lado, hubo un rápido aumento (15min.) de glucosa en sangre, la cual se mantuvo en un nivel alto hasta los 60min. después de la inyección de glucosa. No se observaron cambios en las concentraciones de glucosa en sangre de los peces inyectados con solución salina.

3.4. Análisis Filogenético

Determinamos la relación filogenética entre los genes de las hexocinasas de peces y de mamíferos en un esfuerzo por vislumbrar la evolución de su expresión en los órganos de vertebrados. El árbol filogenético (figura 4) muestra cuatro grupos. El Grupo 1 que corresponde a la familia de genes de referencia de las hexocinasas, también llamado grupo externo. El Grupo 2 que posee las hexocinasas con el extremo amino. Este grupo puede ser dividido en 2 subgrupos: músculo y cerebro. El grupo 3 incluye las hexocinasas con el extremo carboxilo. Este grupo también puede ser dividido en los subgrupos músculo y cerebro. El Grupo 4 tiene el tipo de hexocinasas llamadas glucocinasas, las cuales tienen un peso molecular de 50 kDa y se expresan en hígado. Otras características que se pueden ver en la figura 4, son que la DrHXX1 hace clado con la isoenzima de cerebro de mamíferos, así como con

la DrHXK2 de músculo. Ésta característica se conserva tanto en los extremos amino y como en las carboxilo. Por ultimo, DrSHXK1, RnHXK3 y HsHXK3 no forman ningún clado.

4. Discusión

Las hexocinasas tienen un papel fundamental en el control de los flujos de carbono, ya que catalizan el primer paso limitante de la glucólisis (Postic et al., 2001). Estamos interesados en estas enzimas en el pez cebra, por que es un importante organismo modelo para la investigación biológica, y como parte de un amplio estudio del metabolismo de carbono en eucariontes que estamos realizando (manuscrito en preparación). El número de genes para esta familia de hexocinasas varia entre grupos taxonómicos; por ejemplo, los seres humanos y los roedores tienen cuatro de estos genes, mientras que la levadura y el nematodo tienen tres. En el GenBank del NCBI existen seis secuencias anotadas en el genoma del pez cebra como hexocinasas y confirmamos que estas codifican para este tipo de enzimas mediante el análisis de sus mRNA por RT-qPCR y mediante el estudio de su relación filogenética con hexocinasas de otros grupos taxonómicos. De estas, DrGLK parece ser el ortólogo de la glucocinasa hepática de mamífero (RnGLK de rata y HsGLK de humano) sobre la base del 85% de homología y peso molecular similar, su expresión específica en hígado (figura 2), la respuesta al ayuno y a la administración de glucosa (figura 3) así como el clado al cual pertenecen (figura 4).

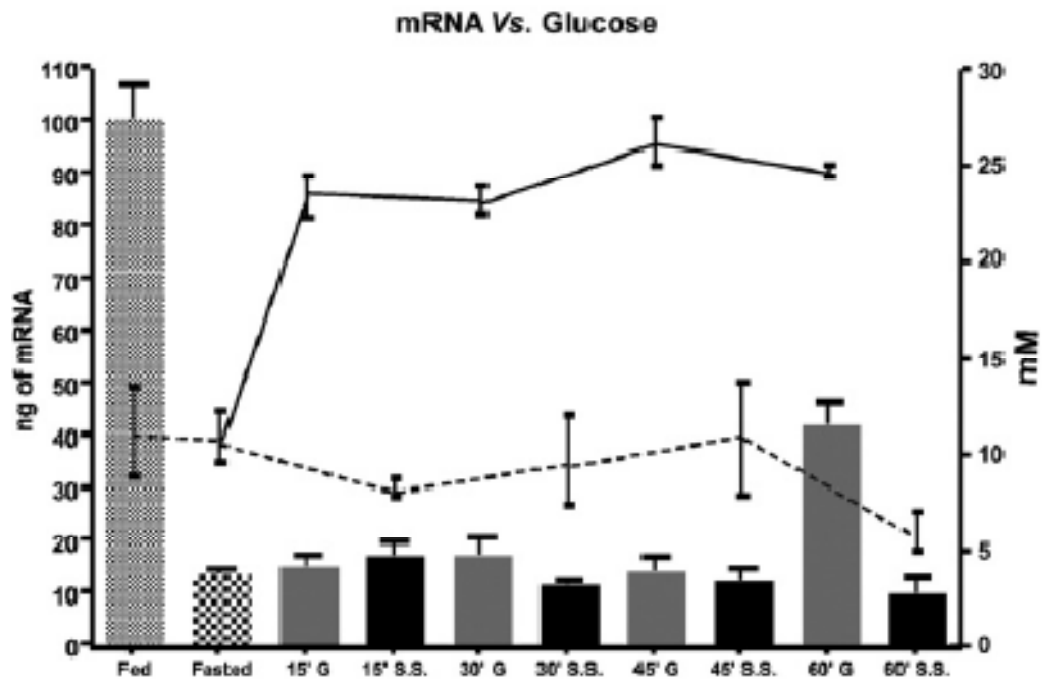


Figura 3. Nivel de expresión del gen DrGLK a través del tiempo después de la administración de glucosa. El histograma indica la cantidad de mRNA de DrGLK; barras en color negro para peces inyectados con solución salina (S.S.) y en gris para los peces inyectados con glucosa (G). La línea punteada indica la concentración de glucosa en sangre del grupo S.S. mientras que la línea continua indica la concentración de glucosa en sangre del grupo G. La comparación entre alimentados y ayunados muestra una disminución del nivel de expresión cuando los peces estaban en ayuno, mientras que la concentración de glucosa permanece prácticamente constante a través del tiempo. Para el grupo G (gris) el nivel de expresión de DrGLK fue restablecido cerca del 50% con respecto a los alimentados 60 min. después de la inyección, mientras que rápidamente incrementó la concentración de glucosa y permaneció así durante la primera hora.

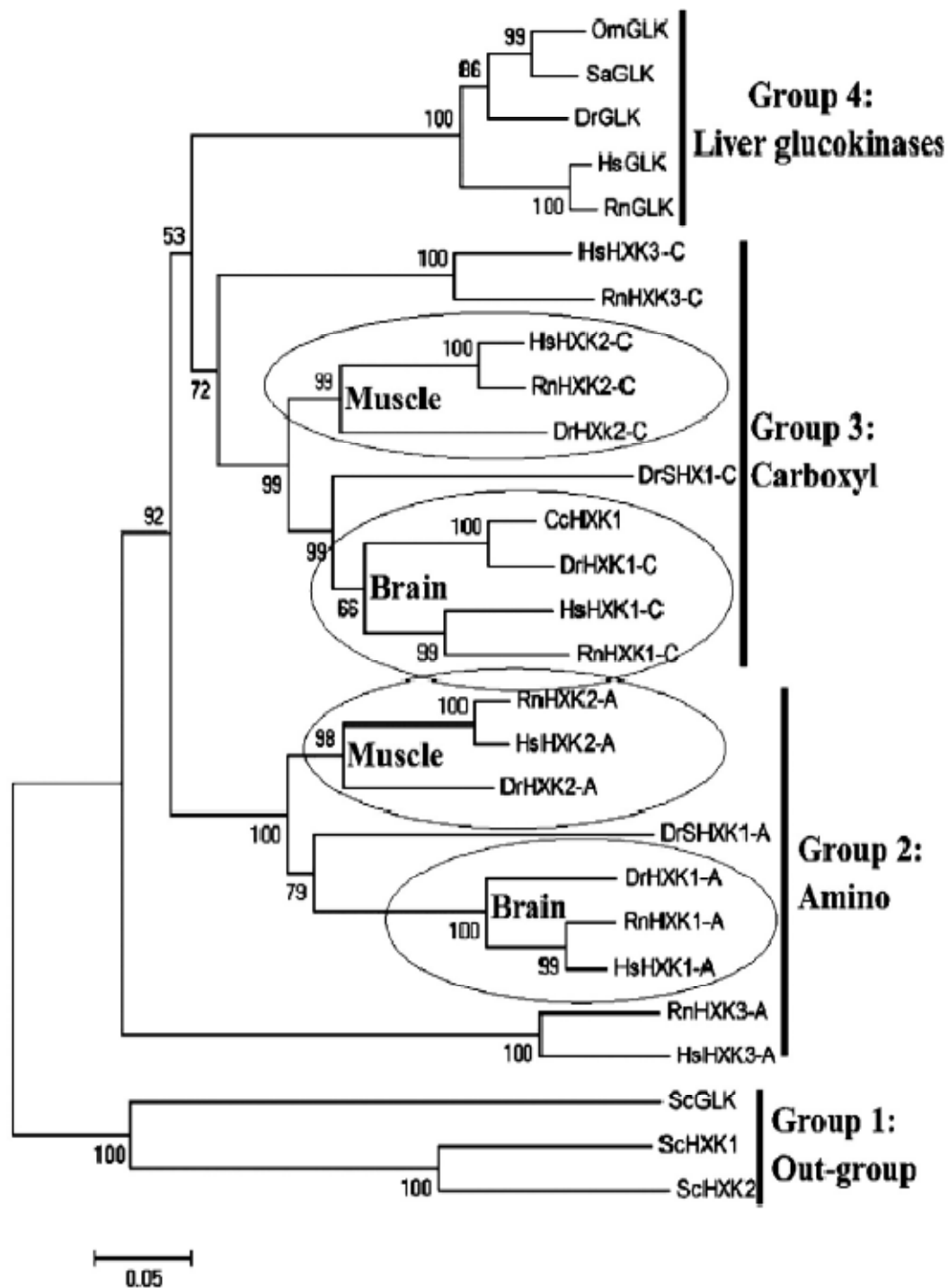


Figura 4. Árbol filogenético de las proteínas hexocinasa de distintas especies. El árbol fue construido usando el software MEGA versión 4.0 (Tamura et al., 2007), por el método de N.J. con un valor de Bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores de Bootstrap están indicados sobre las ramas. La A y la C después del nombre del gen denotan la mitad amino y carboxilo respectivamente. Los

círculos indican los subgrupos cerebro y músculo. Los números de acceso están indicados en la Tabla 1. Las abreviaciones son las mismas que en la figura 1. Véase el texto para la explicación detallada.

En mamíferos, la GLK hepática tiene una Km muy alta por la glucosa, lo que permite que la glucosa entre al hígado y se acumule como glucógeno durante el periodo posterior a la absorción. La GLK es también un componente importante de la regulación de glucosa en sangre, que actúa como el censor principal de glucosa en células beta pancreáticas, hepatocitos y regiones del cerebro como el hipotálamo (Matschinsky 1990; Polakof et al., 2007). Por otro lado, el gen DrGLK es más corto que el ortólogo de mamíferos, así como su cDNA (800 vs. 1200 pb) que tiene 7 exones en comparación con los 10 de mamíferos (Figura 1), aunque su cDNA es similar al cDNA de la GLK hepática en otros peces, como la trucha dorada, la trucha arcoíris y la carpa común (Panserat et al., 2000a). Las otras dos secuencias del pez cebra de 50 kDa, anotadas como genes hexocinasa en el GenBank, DrADPGK1 y DrADPGK2 tienen baja homología con la GLK hepática de mamífero (2-5%) y niveles de expresión muy bajos en los órganos estudiados. Por lo tanto, no los incluimos en el análisis de expresión y filogenia.

En el genoma del pez cebra hay tres genes de hexocinasa adicionales con un peso molecular de 100 kDa, que son DrH XK1, DrH XK2 y DrSH XK1. Ellos han sido considerados como producto de la fusión de un gen ancestral de 50 kDa

(Tsai y Wilson, 1995) y tienen 50-85% de identidad con las HXKs I, II y III de mamíferos. DrHXK1 es probablemente el ortólogo de RnHXK1 y HsHXK1, mientras que DrHXK2 parece ser el ortólogo de RnHXK2 y HsHXK2, sobre la base de 50-85% de homología de secuencia, similar peso molecular (Figura 4), expresión en los mismos órganos (Figura 2), similar respuesta al ayuno y a la administración de glucosa (Figura 3). Al igual que en los mamíferos, la evolución ha dispersado a esta familia de genes de hexocinasas del pez cebra por sus diferentes cromosomas. En los seres humanos, por ejemplo, HsHXK1, HsHXK2, HsHXK3 y HsGLK se encuentran localizados en los cromosomas, 10q22, 2p13, 5q35.2 y 7p15.3–p15.1; respectivamente (NCBI). De hecho, miembros de muchas familias de genes en los animales están localizados en diferentes cromosomas. El criterio para considerar familias de genes está relacionado con parámetros, como el porcentaje de similitud mayor a 50%, la ontología de genes, la conservación y actividad de sus dominios, la conservación estructural, etc. (Li 1997).

Es interesante, el hecho de que la distribución de los genes de las HXKs en los órganos sea similar en el pez cebra con respecto a los mamíferos, y que también estén relacionados filogenéticamente (figuras 2 y 4). DrHXK1, RnHXK1 y HsHXK1 prevalecen en cerebro; DrHXK2, RnHXK2 y HsHXK2 se expresan principalmente en músculo y DrGLK, RnGLK y HsGLK se expresan en hígado. Estas semejanzas en los patrones de expresión, sugieren que su distribución en los órganos, y por tanto, su ontogénesis, pudo haber sido la misma que en su último ancestro común, antes de la división de los ciprínidos y los

mamíferos, hace aproximadamente 450 millones de años (Powers 1991). Además del bajo nivel de expresión de DrADPGK1 y DrADPGK2, estas no hacen ningún clado (datos no mostrados), por lo tanto, es difícil establecer sus relaciones filogenéticas y ortología.

Aunque la familia multigénica de las hexocinasas existe en muchas especies, su respuesta a carbohidratos difiere considerablemente entre ellas, por ejemplo, los seres humanos tienen una glucocinasa hepática que se adapta según sea la entrada de glucosa a la vena porta, incrementando su actividad enzimática con el aumento del aporte de glucosa. (Borrebaek et al., 1970). En anfibios como el sapo (*Bufo spinulosus*), la actividad de la glucocinasa no cambia después de varios días de ayuno (Ureta et al., 1978). La respuesta es variable en diferentes especies de peces, y han sido clasificados de acuerdo a su pobre, intermedia o buena utilización de glucosa (Panserat et al., 2000a), la respuesta del pez cebra, no había sido estudiada antes.

Se estudiaron los niveles de mRNA de DrSHXK1, DrHXK1, DrHXK2 y DrGLK en hígado, músculo, cerebro y corazón, con un ayuno de 48hrs, seguido de la administración de glucosa. Encontramos que, como en mamíferos, el único gen que responde a la glucosa es DrGLK en el hígado, disminuyendo su expresión en casi un 85%, mientras que la expresión de los otros genes no cambio en el resto de los órganos estudiados (resultados no mostrados). La figura 3 muestra los cambios del mRNA de DrGLK en función del tiempo después de la

administración de glucosa. Se puede ver que, la glucosa en sangre aumenta inmediatamente después de su administración, mientras que la expresión del RNAm de DrGLK incremento cerca del 50% con respecto a los alimentados 1hr después su administración. La inyección con solución salina no cambio la expresión de DrGLK o la concentración de glucosa durante la primera hora después de su administración. Estos resultados indican que, aunque la inyección IP induce estrés y éste indiscutiblemente altera el metabolismo energético de los peces, no se refleja en la expresión del gen glucocinasa. Por lo tanto, se observa que los efectos genéticos de la suspensión y la readministración de glucosa son similares a lo observado en mamíferos.

El árbol filogenético de la figura 4, confirma la ortología entre los genes de las hexocinasas del pez cebra y de mamíferos. Por ejemplo, DrHXK1, DrHXK2 y DrGLK se expresan en los mismos órganos en ambos grupos taxonómicos. Dos hechos adicionales se pueden ver en la figura 4: 1) el extremo amino de RnHXK3 y HsHXK3 fue separado antes que la glucocinasa hepática y parece ser la secuencia ancestral de HXKs y GLK en vertebrados; 2) el extremo carboxilo de estas HXKs se separó después de las GLKs hepáticas siendo probablemente ortólogos a la secuencia ancestral del extremo carboxilo en vertebrados. Por ultimo, para investigar las secuencias reguladoras del pez cebra, la rata y el humano, se analizaron 1500pb río arriba del codón de iniciación (ATG), de los genes de HXK de estas especies, utilizando el software del servidor TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/>) para este propósito. No encontramos ninguna relación entre los perfiles de expresión en los órganos

estudiados del pez y de mamíferos con la posible presencia de factores transcripcionales. Especulamos que las secuencias responsables de la regulación de la expresión en los órganos no fueron incluidas en los segmentos analizados.

En conclusión, confirmamos que el genoma del pez cebra tiene seis genes de hexocinasas: DrGLK, DrADPGK1, DrADPGK2, DrH XK1, DrH XK2 y DrSHXK1. DrGLK y DrSHXK1 se expresan principalmente en hígado, DrH XK1 en cerebro y corazón, mientras que DrH XK2 en músculo. Su ortología con mamíferos (rata y humano) es de la siguiente manera: DrGLK es la ortóloga a GLK, DrH XK1 es a HXK1 y DrH XK2 es a HXK2. DrGLK tiene una respuesta similar al ayuno y a la administración de glucosa así como la tiene la GLK hepática de mamíferos. Como perspectiva a esto, queda analizar en detalle el papel de la DrGLK en la homeostasis de la glucosa en el pez cebra.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Marcela Fregoso Cervón, de la Escuela de Veterinaria de la UNAM, por su asistencia para la disección de los tejidos de los peces. Este trabajo fue apoyado por las subvenciones de los proyectos 57597 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e IN225508-3 de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la UNAM (PAPYT).

REFERENCIAS

- Borrebaek, B., Hultman, E., Nilsson, L.H., Roch-Norlund, A.E., Spydevold, O., 1970. Adaptable glucokinase activity of human liver. *Biochem. Med.* 4, 469–475.
- Egea, M., Meton, I., Baanante, I.V., 2007. Sp1 and Sp3 regulate glucokinase gene transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Mol. Endocrinol.* 38, 481–492.
- Grossbard, L., Schimke, R.T., 1966. Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. *J. Biol. Chem.* 241, 3546–3560.
- Harmon, J.S., Eilertson, C.D., Sheridan, M.A., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucoseinjected rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 261, R609–613.
- Higgins, D.G., Sharp, P.M., 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73, 237–244.
- Katzen, H.M., Schimke, R.T., 1965. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1218–1225.
- Katzen, H.M., Soderman, D.D., Nitowsky, H.M., 1965. Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose-ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 377–382.

- Li, W.H., 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Matschinsky, F.M., 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39, 647–652.
- Matschinsky, F.M., Magnuson, M.A., Zelent, D., Jetton, T.L., Doliba, N., Han, Y., Taub, R., Grimsby, J., 2006. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55, 1–12.
- Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 243–249.
- Niemeyer, H., Ureta, T., Clark-Turri, L., 1975. Adaptive character of liver glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* 6, 109–126.
- Nüsslein-Volhard, C., 2002. *Zebrafish*. Oxford University Press Inc., New York.
- Panserat, S., Blin, C., Medale, F., Plagnes-Juan, E., Breque, J., Krishnamoorthy, J., Kaushik, S., 2000a. Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta* 1474, 61–69.
- Panserat, S., Medale, F., Blin, C., Breque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000b. Hepatic glucokinase is

induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1164–1170.

Polakof, S., Miguez, J.M., Moon, T.W., Soengas, J.L., 2007. Evidence for the presence of a glucosensor in hypothalamus, hindbrain, and Brockmann bodies of rainbow trout. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, 1657–1666.

Postic, C., Shiota, M., Magnuson, M.A., 2001. Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog. Horm. Res.* 56, 195–217.

Powers, D.A., 1991. Evolutionary genetics of fish. *Adv. Genet.* 29, 119–228.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.

Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S., Moon, T.W., 2006. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R810–R821.

Storer, A.C., Cornish-Bowden, A., 1976. Kinetics of rat liver glucokinase. Cooperative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. *Biochem. J.* 159, 7–14.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.

- Tsai, H.J., Wilson, J.E., 1995. Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of chimeric hexokinases constructed from the N- and C-terminal domains of the rat type I and type II isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 206–214.
- Ureta, T., 1982. The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. *Comp. Biochem. Physiol. B* 71, 549–555.
- Ureta, T., Gonzalez, C., Niemeyer, H., 1971a. Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. II. Chromatographic patterns of glucokinase and hexokinases in the liver of rodents. *Comp. Biochem. Physiol., B* 40, 81–91.
- Ureta, T., Gonzales, C., Lillo, S., Niemeyer, H., 1971b. Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. I. The influence of fasting and the nature of the diet on liver glucokinase and hexokinases of rodents. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 40, 71–80.
- Ureta, T., Radojkovic, J., Diaz, N., Slebe, J.C., Lozano, C., 1978. Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. Identification and characterization of amphibian liver hexokinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 186, 235–247.
- Van Schaftingen, E., 1994. Short-term regulation of glucokinase. *Diabetologia* 37 (Suppl. 2), S43–47.
- Wilson, J.E., 1995. Hexokinases. *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.* 126, 65–198.